

## CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO E OÓCITOS COMO ALTERNATIVA PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

### *OVARIAN TISSUE AND OOCYTES CRYOPRESERVATION AS AN ALTERNATIVE FOR FERTILITY PRESERVATION*

Cristiane Pereira **GRUNDMANN**<sup>1</sup>, Rayana **SKROCH**<sup>1</sup>,  
 Maria Cecília Da Lozzo **GARBELINI**<sup>2</sup>, Alessandro **SCHUFFNER**<sup>3</sup>

Rev.Méd.Paraná/1307

Grundmann CP, Skroch R, Garbelini MCDL, Schuffner A. Criopreservação de Tecido Ovariano e Oócitos como Alternativa para Preservação da Fertilidade. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2011; 69(1):19-25.

**RESUMO** - Com os avanços no diagnóstico e tratamento de neoplasias, obteve-se nos últimos anos um grande aumento na expectativa de vida. Em pacientes do sexo feminino, ocorre com frequência a Falha Prematura Ovariana (FPO), pois os ovários são muito sensíveis ao tratamento citotóxico. Para isso a criopreservação de tecido ovariano e de gametas é importante no caso de pacientes com doenças neoplásicas, bem como em portadoras de doenças autoimunes em meninas pré-púberes a indicação é de criopreservar o tecido ovariano. Estudos experimentais e clínicos relataram sucesso após transplante autólogo de fragmentos do córtex ovariano. Portanto é responsabilidade ética oferecer a possibilidade de criopreservação de tecido ovariano por um protocolo institucional para todas as adolescentes e mulheres jovens que precisam se submeter a tratamentos radicais, para que futuramente desenvolvam uma condição reprodutiva.

**DESCRITORES** - Criopreservação. Tecido Ovariano. Câncer. Falha Prematura Ovariana.

### INTRODUÇÃO

Com os avanços recentes no diagnóstico e tratamento de neoplasias, houve um grande aumento na expectativa de vida das crianças, dos adolescentes e dos adultos. A quimioterapia e radioterapia podem curar mais de 90% das meninas e mulheres jovens afetadas por neoplasias. No entanto, os ovários são muito sensíveis ao tratamento citotóxico podendo ocasionar Falha Prematura Ovariana (FPO), mesmo que os ovários não estejam afetados pela doença. A FPO resulta em menopausa precoce e distúrbios funcionais, tais como disfunção sexual, níveis alterados de lipoproteínas, maior risco de osteoporose e de doenças cardíacas dentre outros <sup>(8)</sup>.

A falência ovariana prematura pode ocorrer em mulheres com doenças genéticas (como a síndrome de Turner), após a quimioterapia ou a radioterapia para doença maligna, doenças dos ovários (como cistos, tumores benignos ou endometriomas), ou após a remoção dos ovários para tratar endometriose. Para as mulheres em risco de FPO, há três possibilidades para preservar a sua fertilidade: criopreservação de oócitos, de embriões e, mais recen-

temente, de tecido ovariano <sup>(23)</sup>.

A criopreservação de tecido ovariano é a única opção disponível para meninas pré-púberes e para mulheres em situações nas quais não é possível postergar o início da quimioterapia. Atualmente o congelamento de tecido ovariano pode ser feito por três técnicas: ovário inteiro com pedículo vascular, fragmentos do córtex ovariano e folículos isolados. Até o momento, a maioria das pesquisas em animais e em humanos concentra-se em métodos de congelamento e transplante de fragmentos do córtex avascular, sendo que esta técnica foi a única que possibilitou a ocorrência de nascimentos em humanos até o momento <sup>(8)</sup>.

No campo da criopreservação de tecido ovariano, por indicações oncológicas, não houve grandes modificações desde 1998. Em alguns países, uma abordagem conservadora da fertilidade em casos de neoplasia ginecológica só é válida se o útero é poupado durante a cirurgia. Isso inclui os casos de início de carcinoma do colo do útero, carcinoma vaginal precoce, adenocarcinoma endometrial pre-

Trabalho realizado na Faculdades Pequeno Príncipe.

1 - Acadêmicas de Biomedicina da Faculdades Pequeno Príncipe.

2 - Doutora em Biologia Celular e Tecidual, professora dos cursos de Biomedicina, Enfermagem e Farmácia da Faculdades Pequeno Príncipe.

3- Mestre em Medicina, diretor clínico do Centro de Reprodução Humana Conceber.

coce, tumores de ovário de malignidade baixa e alguns casos selecionados de carcinoma ovariano unilateral. A escolha de uma possível abordagem cirúrgica conservadora nesses pacientes e a questão de programar o tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia varia de acordo com o caso e a escolha médica <sup>(8)</sup>.

Diversas técnicas experimentais de autoimplante ovariano vêm sendo pesquisadas. A multiplicidade de espécies animais e de métodos estudados para a preservação da função ovariana resulta em informações conflitantes quanto à eficácia da manutenção hormonal. Uma vez que o tecido ovariano é congelado há, teoricamente, diversas opções disponíveis para sua utilização futura incluindo autotransplante, xenoenxerto e a maturação *in vitro* <sup>(23)</sup>.

## OBJETIVO

Caracterizar as opções atuais para a criopreservação de tecido ovariano, bem como as diferentes opções disponíveis para preservar a fertilidade de pacientes com câncer. Diagnosticar pelos diversos parâmetros, a opção de preservar a fertilidade em pacientes cuja função gonadal é ameaçada pela menopausa prematura, ou por tratamentos como a radioterapia, quimioterapia e cirurgias.

### Criopreservação de Tecido Ovariano

A preservação do tecido ovariano através de congelamento/descongelamento tem se mostrado um sucesso em experimentos com animais, mas existe ainda a questão de como desenvolver esses folículos imaturos, armazenados no tecido congelado, para posteriormente permitir a fertilização. Teoricamente, existem três estratégias que permitem o desenvolvimento dos folículos: transplante autólogo/heterólogo, transplante xenólogo e cultura *in vitro* <sup>(23)</sup>.

A estratégia mais desejada seria aquela que possibilitasse o crescimento e maturação dos folículos *in vitro*, pois dessa forma haveria a ausência de novos procedimentos cirúrgicos, melhor acompanhamento do desenvolvimento dos folículos e risco zero de transmissão de células neoplásicas. Todavia ainda não se obteve sucesso na sua maturação *in vitro* <sup>(28)</sup>.

O xenotransplante de tecido ovariano humano em ratos imunodeficientes, com o crescimento e maturação de folículos nestes, mostrou ser uma técnica eficaz de desenvolvimento de folículos imaturos armazenados em tecido ovariano congelado <sup>(20)</sup>.

Em estudo recente, Kim et al.<sup>(12)</sup> avaliaram a integridade de oócitos humanos obtidos após transplante xenólogo para ratos imunodeficientes e maturação *in vitro* do complexo cúmulo-oocitário. Através de análise imunocitoquímica de microtúbulos e DNA, alguns oócitos apresentaram-se com anormalidades nucleares e maturação citoplasmática. Além disso, a possibilidade de infecção viral transespécies, além de questões éticas e de segurança, ainda impedem seu uso na prática clínica.

### Falência Ovariana

A quimioterapia quando utiliza agentes alquilantes é reconhecidamente gonadotóxica. A gonadotoxicidade das drogas é variável, sendo algumas extremamente tóxicas (ciclofosfamida, melphalan, clorambucil, ifosfamida, thiotepa e mostarda nitrogenada) <sup>(30)</sup>.

A perda folicular é também dose dependente, sendo que cada curso de quimioterapia resulta em perda adicional proporcional à reserva folicular <sup>(1)</sup>. O risco de falência ovariana aumenta com a idade, simplesmente como consequência da menor reserva ovariana em mulheres com mais idade <sup>(17)</sup>. Mulheres novas possivelmente não experimentarão falência ovariana imediata após o uso de drogas altamente gonadotóxicas, mas eventualmente desenvolverão infertilidade e menopausa precoce <sup>(22)</sup>. Desse modo, a restauração de ciclos menstruais regulares não garante a fertilidade normal <sup>(7)</sup>.

A radioterapia induz dano gonadal pelos efeitos citotóxicos diretos e indiretos (formação de radicais livres) no DNA. Além dessas terapias em pacientes com câncer, pacientes jovens podem, em situações cirúrgicas, ter seus ovários retirados como alternativa terapêutica. Algumas doenças benignas como cistos ovarianos extensos, de natureza progressiva e/ou recorrentes semelhante ao que ocorre em alguns casos de endometriose, cistos mucinosos e teratomas podem ter indicação de ooforectomia bilateral, o que levaria à perda da função endócrina ovariana e de 100% da reserva folicular <sup>(30)</sup>.

Algumas condições tidas como benignas também podem levar à perda da função endócrina ovariana em decorrência do tratamento instituído. Doenças como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, a doença de Behçet e outras autoimunes podem ser tratadas com quimioterapia e/ou radioterapia nos dias atuais <sup>(16)</sup>.

## METODOLOGIA

### Congelamento

Considerando que os tecidos biológicos se encontram na temperatura de 37°C e que nenhuma atividade biológica ocorre na temperatura de -196°C, os maiores danos durante a criopreservação encontram-se durante as transições de temperatura: no congelamento até -196°C e no descongelamento até 37°C. Além disso, evitar a formação de cristais de gelo e o aumento da concentração de eletrólitos e de outros solutos parece ser os principais objetivos para permitir a criopreservação adequada <sup>(23)</sup>.

Newton et al.<sup>(19)</sup> postularam que, com o objetivo de diminuir a injúria, a taxa de congelamento deveria ser rápida o suficiente para diminuir a exposição das células a altas concentrações intracelulares de eletrólitos e lenta o suficiente para desidratar as células e evitar a formação de cristais. A escolha do crioprote-

tor com a máxima permeabilidade e mínima toxicidade e potencial de formação de cristais, deve ser específico para cada célula e tipo de tecido.

De acordo com Prates<sup>(23)</sup>, o método padrão para a criopreservação de tecido ovariano deve ser o congelamento lento e programado usando meio contendo albumina humana associado ao propanediol, dimetilsulfóxido ou etilenoglicol como crioprotetor combinado ou não à sacarose. Com essa metodologia, as taxas de sobrevivência de folículos obtidos de tecido congelado têm ficado em torno de 70 – 80%.

### **Fragmentos de Tecido Ovariano Cortical**

Até 2006, o tecido ovariano tinha sido criopreservado com sucesso e transplantado em roedores, coelhos, ovinos e macacos sagui. Donnez et al.<sup>(8)</sup> citaram uma recente revisão de estudos experimentais, onde foi observado um aumento significativo na proporção do crescimento folicular, de menos de 20% nos ovários antes do enxerto para mais de 70%, aos 7, 30 e 60 dias após a realização do enxerto. Na sequência do autoimplante, o número de folículos antrais e a secreção de inibina 1 foram reduzidos, resultando num aumento dos níveis basais de hormônio foliculo estimulante (FSH). Os estudos experimentais indicaram que a queda no número de folículos primordiais no tecido enxertado ocorre devido à hipóxia. A perda de folículos primordiais em tecido ovariano criopreservado após o transplante é estimado a 50-65% em alguns casos (2, 5, 6, 25).

Kim et al. (2004)<sup>(11)</sup>, indicaram uma correlação entre a lesão tecidual isquêmica e a duração da isquemia. Foi demonstrado que o fator de crescimento endotelial vascular não acelera a revascularização. O córtex ovariano pode tolerar a isquemia por três horas a 4°C. O mesmo autor relata que o ácido ascórbico (usado como antioxidante) reduz apoptose em córtex ovariano em até 24 horas, no caso de incubação *in vitro*. Em seu estudo, danos isquêmicos significativos foram evidenciados pela diminuição do consumo de oxigênio e aumento da apoptose. Além disso, verificou-se que as células do estroma eram mais vulneráveis à isquemia do que os folículos primordiais.

Independente da duração da incubação, pode ocorrer lesão do córtex ovariano no congelamento ou descongelamento do tecido (27).

O crioprotetor escolhido deve ter a máxima capacidade de penetração através do estroma e das células da granulosa, mas também deve ter a mínima toxicidade e uma ínfima capacidade de formação de cristais de gelo (23).

### **Transplante de Ovário Inteiro com Reanastomose Vascular**

Outra estratégia que vem sendo estudada é o transplante do ovário inteiro com reanastomose vascular. Através desta técnica, obtém-se fluxo sanguíneo imediato para o órgão transplantado, minimizando a

injúria causada pela isquemia a qual pode levar a uma redução da reserva folicular e conseqüente diminuição da sobrevida do tecido. Wang et al.<sup>(31)</sup> descreveram o sucesso que obtiveram com essa técnica em ratas quando congelaram a parte superior do útero, do oviduto bem como do ovário com sua vascularização e depois realizaram o transplante com anastomose vascular. A função reprodutora normal foi restabelecida em quatro de sete animais (57%) submetidos a esse tratamento, sendo que em uma fêmea constatou-se a prenhez.

Ao contrário do congelamento de células únicas, o congelamento de um tecido é muito mais difícil, visto que há uma grande quantidade de diferentes células (11). O maior dano que ocorre durante o processo de congelamento é a formação intracelular de cristais de gelo e aumento da concentração de sais e, normalmente, a fase em que isso ocorre é durante o congelamento entre -10°C e -40°C (23).

A principal desvantagem da criopreservação de tecido ovariano, seguido por transplante avascular, é que o enxerto é completamente dependente do estabelecimento de uma nova vascularização e, como resultado, uma grande quantidade de folículos são perdidos. A redução do intervalo entre o transplante isquêmico e a revascularização é essencial para a manutenção da reserva folicular e extensão da vida e da função do enxerto. Em teoria, a melhor maneira de conseguir isto é realizar o transplante de ovário intacto com anastomose vascular, possibilitando a revascularização imediata do transplante (5, 8, 10, 19).

De acordo com estudos realizados, a criopreservação de ovários intactos em grandes mamíferos e nos seres humanos pode ser mais problemática do que em pequenos animais, devido à dificuldade de difusão adequada de agentes crioprotetores nos tecidos principais e prejuízo vascular causado pela formação de cristais de gelo intravascular<sup>(3, 4, 8)</sup>.

Estudos em humanos já vêm sendo realizados, inclusive com a adoção de protocolos de descongelamento. Martinez-Madrid et al.<sup>(15)</sup> descreveram um protocolo de criopreservação ovariano humano com seu pedículo vascular, no qual mostraram elevadas taxas de sobrevivência de folículos (75,1%), sendo que os pequenos vasos e o estroma ovariano apresentavam uma estrutura histológica normal em todos os seus componentes após o descongelamento. Entretanto, até o momento, ainda não há relatos de nascimentos ou gravidez na literatura utilizando esse protocolo.

Ainda são poucos os estudos nos quais a recuperação da função ovariana após transplante de folículos possibilitou índices reprodutivos adequados. Segundo a maioria dos autores, o pedículo vascular em casos de autoimplante ovariano é fundamental para a viabilidade do órgão, já que os implantes avasculares que preservam a função endócrina acompanham-se de índices gestacionais inexpressivos (10).

### Descongelamento

A criopreservação do tecido ovariano através da técnica de congelamento lento e descongelamento rápido tem obtido melhores resultados nos últimos anos, mas ainda não atingiu o ideal <sup>(13)</sup>.

De acordo com o protocolo rápido de Newton et al.<sup>(19)</sup> o descongelamento de cada fragmento de ovário é realizado individualmente na manhã do transplante, sendo que os tubos que contêm os fragmentos ovarianos são colocados em banho-maria à temperatura de 37°C por três minutos sob agitação e, a seguir, o tecido ovariano é então exaustivamente lavado em meio de cultura tamponado.

Os fragmentos ovarianos descongelados são colocados em tubos numerados contendo meio de cultura tamponado e, em gelo, rapidamente são transportados para a realização do transplante. Quando o descongelamento é lento, corre-se o risco da água que se descongela recristalizar, causando novos danos. Já quando o descongelamento é rápido, a queda brusca na pressão osmótica extracelular pode levar a rápidas mudanças na água intra e extracelular, levando à distensão e danos sobre esta (choque extracelular). Esse seria o terceiro problema a ser evitado para obter sucesso na criopreservação <sup>(23)</sup>.

### Relato de Autotransplante de Tecido Ovariano Humano Criopreservado

O primeiro transplante bem sucedido de tecido ovariano criopreservado resultando em uma gravidez e nascido vivo ocorreu no ano de 1997, onde uma mulher de 25 anos apresentando linfoma de Hodgkin em estágio clínico IV realizou a criopreservação de tecido ovariano antes de se submeter à quimioterapia. Por laparoscopia, foram feitas cinco biópsias corticais de 12-15mm de comprimento e 5mm de largura do ovário esquerdo. A remoção do ovário inteiro não foi uma opção, porque nunca se pode excluir totalmente a recuperação da função ovariana após a quimioterapia. Realizada a laparoscopia, a paciente recebeu quimioterapia durante seis meses, seguida por radioterapia <sup>(8)</sup>.

Oktay e Karlikaya<sup>(21)</sup> relataram transplante laparoscópico de tecido ovariano descongelado para a parede lateral pélvica em uma paciente de 29 anos, que tinha se submetido à ooforectomia bilateral de uma doença não maligna. A paciente foi estimulada com gonadotrofinas uma vez após 15 semanas, e depois novamente após 10 meses. O desenvolvimento folicular foi demonstrado pela ultra-sonografia e a ovulação ocorreu em resposta à administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) <sup>(8, 21)</sup>.

Muito recentemente Donnez et. al<sup>(8)</sup> aplicaram uma técnica, similar à utilizada por Silber et al.<sup>(29)</sup>, para transplante de córtex ovariano fresco entre gêmeos monozigóticos, em uma paciente que havia sofrido transplante de medula óssea e dois regimes de agentes alquilantes em 2000, para linfoma não Hodgkin. A criopreservação de tecido ovariano foi realizada um ano após a quimioterapia. Para este procedimento foi retirado um ovário e realizadas biópsias do córtex ovariano, nas quais se constatou a presença de folículos primordiais histologicamente normais.

Seis peças corticais ovarianas, medindo 10x 4-5mm foram então enxertadas no restante do ovário, após a remoção do córtex ovariano. A paciente apresentou um ciclo ovulatório a cada cinco semanas, e os níveis pré-ovulatórios E2 (estradiol) atingiram valores entre 210 e 356pg/ml.

A análise desses casos levanta pontos importantes para discussão. Em primeiro lugar foram necessários entre 4,5 e cinco meses para que o folículo pudesse ser observado após a reimplantação de tecido ovariano. O processo de foliculogênese leva entre quatro a seis meses sendo que, durante esse tempo, os oócitos e as células foliculares circundantes atravessam uma série de transformações que eventualmente resultam em diversos folículos antrais capazes de produzir oócitos maduros. Assim, o aparecimento do primeiro folículo, comprovado por laparoscopia, foi totalmente consistente pelo tempo esperado. Este intervalo de tempo entre o implante de tecido cortical e o primeiro pico de E2, confere com dados obtidos de ovinos e seres humanos, embora algumas variações pudessem ser observadas. A demora entre o transplante e desenvolvimento folicular foi encontrada variando de oito semanas a oito meses. Tal variação pode ser explicada por uma diferença na reserva folicular no momento da criopreservação <sup>(8)</sup>.

Outra constatação interessante é a persistência de níveis elevados de FSH durante a fase folicular. Os níveis de FSH mantiveram-se elevados como 25 mIU/ml durante a fase de crescimento folicular até a ovulação e depois baixaram para <15mIU/ml durante a fase lútea. Isto pode constituir um argumento contra o uso de gonadotrofina injetáveis. Os níveis relativamente elevados de FSH podem ser explicados pela quantidade reduzida dos folículos primordiais que sobrevivem após o enxerto <sup>(28)</sup>.

Radford et al.<sup>(24)</sup> descreveram um caso de paciente com história de doença de Hodgkin, tratada pela quimioterapia, cujo tecido ovariano foi retirado por biópsia e criopreservado. Após quatro anos, o tecido ovariano foi reimplantado. Neste caso, o corte histológico do tecido cortical ovariano revelou apenas alguns folículos primordiais, por causa da quimioterapia realizada anteriormente à criopreservação. O valor detectado do estradiol e os níveis de FSH e hormônio luteinizante (LH) se apresentaram reduzidos após oito meses ao reimplante. A paciente teve um período menstrual, mas nove meses após o reimplante as concentrações de LH e FSH retornaram definitivamente para níveis de menopausa.

Segundo Shaw et al.<sup>(28)</sup> o risco de FPO após a quimioterapia em pacientes jovens é cerca de 80% a 90%, tendo em vista fatores importantes tais como o tipo de droga, a dose utilizada e a idade da paciente.

No caso de uma paciente que foi declarada sadia em relação a uma neoplasia em 2003, o transplante de tecido ovariano foi realizado. Uma tira com diversos pequenos cubos de tecido ovariano descongela-

do foi implantada através de uma janela peritoneal bem próximo ao ovário direito. Quatro meses após o transplante, foi realizada uma laparoscopia para verificar a viabilidade do enxerto ortotópico, e para reimplantar o restante dos cubos ovarianos corticais. Uma estrutura folicular foi claramente visível na área onde o tecido foi reimplantado fora do ovário da paciente. A biópsia e análise histológica por sonda de fluorescência com coloração vital revelaram a presença de folículos primordiais viáveis e uma estrutura folicular com células marcadas para a inibina A. De cinco a nove meses após o reimplante, as concentrações de FSH, E2 e progesterona mostraram a ocorrência de ciclos de ovulação. Após 11 meses do reimplante, a paciente engravidou e deu a luz a um bebê saudável<sup>(8)</sup>.

Várias linhas de evidência apoiam a afirmação de que a origem da gestação foi de fato o autotransplante de tecidos criopreservados. A possibilidade de que o oócito foi derivado do ovário nativo é altamente improvável, porque a ecografia vaginal demonstrou o desenvolvimento de um folículo com 18 x 22mm de tamanho fora do ovário durante o ciclo natural que conduziu a gravidez. No mesmo dia, o nível de E2 foi de 156pg/ml e progesterona 0ng/ml. Outro dos principais argumentos é que a laparoscopia realizada quatro meses após o reimplante provou, por visualização direta, o desenvolvimento de um folículo a partir do tecido transplantado e, no exame histológico, biópsias indicaram não só a sobrevivência de folículos primordiais no tecido enxertado, mas também a maturação de um folículo (células da granulosa marcadas por uma inibina). Foi a primeira prova histológica de maturação folicular de tecido ovariano criopreservado reimplantado. Após o parto, a paciente apresentou ciclos ovulatórios a cada 5-6 semanas. Um aumento nos níveis de FSH foi observado demonstrando que o enxerto de ovário ainda estava funcionando após quase três anos depois do transplante<sup>(8)</sup>.

Meirow et al.<sup>(18)</sup> relataram o nascimento de uma criança cuja mãe havia se submetido ao autoimplante ortotópico de tecido ovariano criopreservado em virtude de apresentar FPO após procedimentos quimioterápicos. Oito meses após o transplante, a paciente espontaneamente menstruou. O aumento do hormônio antimülleriano (AMH) e níveis de inibina B foram consistentes com a presença dos primeiros folículos e a ovulação, respectivamente. Nove meses depois do transplante, a paciente experimentou um segundo período menstrual espontâneo. Depois de um ciclo natural modificado, um único oócito maduro foi recuperado e fertilizado. Dois dias depois, o embrião com quatro células foi transferido. A paciente ficou grávida a partir desta transferência de embrião e o bebê nasceu saudável pesando aproximadamente 3kg. A possibilidade de que o oócito foi derivado do ovário nativo é altamente improvável, dada a evidência consistente da FPO após a quimioterapia de alta dose nesta paciente.

Nesse mesmo ano foram relatados resultados de

três casos de transplante de tecido ovariano. Todas as três pacientes obtiveram recuperação da função ovariana, como confirmado pela menstruação. Em uma paciente os folículos foram visíveis na ultrassonografia e houve constatação dos níveis hormonais normais permitindo a obtenção de dois embriões a partir de três oócitos MII, mas não ocorreu a gravidez<sup>(8), (26)</sup>.

Em 2006, a restauração da função ovariana após transplante ortotópico intraovariano e paraovariano de tecidos criopreservados foram relatados em uma mulher tratada para uma doença não cancerosa (anemia falciforme). Foram criopreservados e descongelados 39 pequenos cubos, sendo 24 enxertados no próprio ovário e os 15 cubos restantes em uma janela peritoneal. A ecografia vaginal foi realizada seguida da medida sequencial de FSH, LH, E2 e concentrações de progesterona, que revelaram o início de um ciclo ovulatório quatro meses após o reimplante do tecido ovariano, demonstrando a eficácia do transplante ortotópico e confirmando, mais uma vez, o intervalo de tempo entre o reimplante e o início da ovulação. A paciente teve três ciclos no total, evidenciados pelo desenvolvimento de um folículo e o aumento dos níveis de E2. Referese que o pico alcançado por E2 nunca excedeu 55pg/ml e FSH, que subiu para 40mUI/ml entre os ciclos. No entanto, após estes três ciclos, as concentrações de FSH e LH voltaram aos níveis de esterilidade. Decidiu-se então reimplantar os 30 cubos restantes no ovário. A paciente submeteu-se ao hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) diminuindo assim os níveis de FSH e LH, obtendo um primeiro ciclo ovulatório após quatro meses do reimplante<sup>(8)</sup>.

Recentemente relatou-se uma gravidez após a concepção natural de uma mulher que se submeteu ao transplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado. Foi observado o desenvolvimento folicular em todos os três transplantes: folículos grandes no ovário, apenas uma posição dominante no sulco peritoneal e folículos com 13mm no sítio heterotópico. Níveis detectáveis de hCG e a ultrassonografia confirmaram a presença de uma gravidez viável intrauterina. Infelizmente, esta gravidez, obtida pela concepção natural, terminou em aborto com sete semanas de gestação devido a aneuploidia<sup>(7, 8)</sup>.

### **Criopreservação de Tecido Ovariano e Transplante Autólogo e Heterólogo**

Os pioneiros no transplante ovariano pós-criopreservação demonstraram a capacidade de preservação dos folículos levando à restauração da função ovariana endócrina e da fertilidade<sup>(1)</sup>.

Uma vez que o tecido ovariano foi congelado, ele pode ser transplantado de duas maneiras: Ortotópico – colocando o ovário ou fragmentos de ovário na fossa ovárica próximo ao ligamento infundíbulo pélvico; Heterotópico – implantando o tecido ovariano para o tecido subcutâneo. Uma gravidez espontânea pode, teoricamente, ser obtida quando ocorrer transplante or-

totópico em uma paciente com tubas pérvias. No caso do heterotópico, quando os fragmentos são inseridos no tecido subcutâneo abaixo da fáscia braquiorradial ou no abdome abaixo da fáscia do músculo reto, a gravidez só será possível através da fertilização *in vitro* (FIV) <sup>(1)</sup>.

Ainda não se conhece a longevidade dos fragmentos de tecido ovariano e, desse modo, transplantes repetidos podem ser necessários para permitir a manutenção da função ovariana. Com isso, o transplante heterotópico se torna possível evitando repetidos procedimentos invasivos e anestésias, tornando o acompanhamento e a captação de oócitos mais facilitada. Entretanto, ainda não se conhece o melhor sítio para o transplante e o grande desafio é conseguir obter oócitos maduros e saudáveis <sup>(13)</sup>.

O primeiro caso de transplante de tecido ovariano fragmentado para o tecido subcutâneo foi descrito por Oktay et al. <sup>(21)</sup> e foi realizado em uma paciente de 35 anos com carcinoma cervical em estágio IIIB e que foi submetida à radioterapia pélvica. Após 10 meses do transplante, a ultrassonografia mostrou um folículo dominante de 15mm e quatro folículos antrais, enquanto que os níveis de FSH e LH entre 120 e 227 dias ficaram em torno de 8,6UI/l e 12,8UI/l, respectivamente.

No ano de 2004, Kim et al. <sup>(11)</sup> descreveram um caso de uma mulher de 37 anos que se submeteu a há um transplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado. Após 14 semanas do transplante, a restauração da função endócrina foi demonstrada, porém, 28 semanas após o transplante, a cessação da função ovariana foi evidenciada por altos níveis de FSH (62-99IU/l) e níveis muito baixos de E2.

Wolner-Hanssen et al. <sup>(32)</sup> relataram um transplante de tecido ovariano no antebraço. Dois folículos se desenvolveram, diâmetro máximo de 12,6mm e 6,7mm respectivamente, e o tecido sobreviveu por sete meses. Os autores sugeriram que o risco de exposição do enxerto transplantado sob a pele do antebraço, provavelmente tem maior estresse mecânico, maior pressão e menor temperatura do que na localização dos ovários.

Apesar de todos esses esforços, até o momento não houve nenhum relato de nascido vivo de tecido ovariano criopreservado transplantado heterotopicamente, o que pode ser atribuído ao fato dos folículos nunca atingirem mais do que 15mm. Esse desenvolvimento folicular limitado pode ser devido a diferentes temperaturas e pressões que os folículos são submetidos no tecido subcutâneo, quando comparado à cavidade abdominal <sup>(8)</sup>.

### Considerações Finais

Deve-se considerar que o desenvolvimento e a melhoria na criopreservação ovariana com protocolos de novas técnicas são de grande valia na investigação em curso para realizar o transplante de um ovário inteiro, em casos de FPO. Pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para criopreservar órgãos inteiros, bem como técnicas cirúrgi-

cas para o autotransplante de um ovário com seu pedículo vascular devem ser incentivadas. Esta técnica poderia levar ao transplante dos ovários intactos com anastomose microvascular, realizado de forma imediata para restabelecer a vascularização e minimizar a isquemia pós-transplante que é responsável pela redução da densidade folicular <sup>(23)</sup>.

Uma das questões éticas mais importantes é garantir que a intervenção não prejudique o paciente, atrasando o tratamento do câncer e que não haja células metaplásicas remanescentes no transplante. Levando estes pontos em consideração, devem-se proteger os direitos do paciente, para que seus gametas sejam preservados após a melhora total, bem como a legislação que aborda a disposição dos gametas se o paciente vier a falecer.

Apesar de uma adolescente ser mais vulnerável, ela deve ter maturidade suficiente para compreender os riscos e benefícios do procedimento, quando o consentimento do congelamento do tecido ovariano é solicitado antes de iniciar a quimioterapia. O consentimento deve ser amplamente discutido, incluindo seus pais ou responsáveis para minimizar o risco de conflitos de interesse. Respeitando o código de boas práticas, todos os pacientes que podem se tornar inférteis têm direito a receber a devida consideração dos seus interesses para futuras possibilidades de preservação da função ovariana. Assim pode-se oferecer uma melhor qualidade de vida a esses pacientes.

A criopreservação de tecido ovariano ainda deve ser considerada como protocolo experimental, em pacientes cuidadosamente selecionadas, considerando-se apenas a possibilidade futura do uso. Como ainda existem diversos questionamentos a respeito de quem são as melhores candidatas, qual o melhor método para a retirada do tecido, qual a melhor forma de congelamento/descongelamento, se o ovário deve ser criopreservado inteiro ou em fatias e qual o tamanho dessas fatias, qual o melhor local para o transplante e se deve ser realizada anastomose vascular ou não, preconiza-se que novos estudos científicos experimentais ainda devem ser realizados, inclusive avaliando se essa é a melhor forma de preservação da fertilidade nesse tipo de paciente <sup>(23)</sup>.

Grundmann CP, Skroch R, Garbelini MCDL, Schuffner A. Ovarian Tissue and Oocytes Cryopreservation as an Alternative for Fertility Preservation. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2011; 69(1):19-25.

**ABSTRACT** - With advances in diagnosis and treatment of cancer, it was obtained, in recent years, a significant increase in life expectancy. In female patients, frequently occurs Premature Ovarian Failure (POF), because the ovaries are very sensitive to cytotoxic treatment. Cryopreservation of ovarian tissue and gametes are important for patients with neoplastic diseases, as also patients who suffers from autoimmune diseases. Prepubertal girls the indication is to cryopreserve ovarian tissue. Experimental and clinical studies have reported success after autologous transplantation of ovarian cortex fragments. So, it's an ethical responsibility offering the possibility of cryopreservation of ovarian tissue via an institutional protocol for all adolescents and young women who need to undergo radical treatment, so that in the future, they could develop a reproductive condition.

**KEYWORDS** - Cryopreservation. Ovarian Tissue. Cancer. Premature Ovarian Failure.

## REFERÊNCIAS

- Akar M, Oktay K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends Endocrinol Metab.*2005; 16, 8:374-380.
- Almodin C, Minguetti-Câmara V, Meister H, Ferreira J, Franco R, Cavalcante A, et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Human Reprod.* 2004; 19: 1287-93.
- Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum Reprod.*2005; 20:3554-3559.
- Bedaiwy MA, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, Biscotti Falcone. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril.* 2003; 79: 594-602.
- Candy J, Wood M, Whittingham D. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod.*1995; 10: 2334- 2338.
- Candy J, Wood M, Whittingham D. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod.*2000; 15: 1300-1304.
- Demeestere I, et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist.*2007; 12: 1437-1442.
- Donnez J, Martinez B, Jadoul P, Langendonck A, Demylle D, Dolmans M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproduction Update.*2006; 5:519-535.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.*2004;9: 680-691.
- Gunasena K, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod.*1997; 12: 101-106.
- Kim S, Yang H, Kang H, Lee HH, Ko DS, Gosden RG. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril.*2004; 82: 679-685.
- Kim S, Kang H, Kim N, Lee H. Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. *Huma Reproduction.*2005; 20: 2502-2508.
- Kim S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril.*2006; 85: 1-11.
- Leporrier M, Theobald P, Roffe JL, Muller G. A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation. *Heterotopic ovarian autotransplantation.* *Cancer.*1987; 60: 2201-2204.
- Martinez-Madrid B, Donnez J. Technical challenges in freezethawing of human ovary. *Fertil Steril.* 2005; 83:1069-1070.
- Mattle V, Behringer K, Engert A, Wildt L. Female fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases. *Eur J Haematol.*2005; 75: 77-82.
- Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update.*2001; 7: 535-543.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med.*2005; 353:318-321.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod.*1996; 11: 1487-1491.
- Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden R. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction.*1998; 13:1133-1138.
- Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med.*2000; 342:1919.
- Poniatowski B, et al. Chemotherapy induced menopause: a literature review. *Cancer Invest.*2001; 19: 641-648.
- Prates L. Transplante Autólogo de Tecido Ovariano para o Peritônio de Ratas após Congelamento e Descongelamento. Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Saúde da Mulher, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- Radford JA, Lieberman BA, Brison D, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet.* 2001; 357:1172-1175.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz R, Guerin J, Lornage J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertil Steril.* 2002; 77: 403-408.
- Schmidt KL, Yding Andersen C, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Andersen A. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod.*2005; 20:3539-3546.
- Schnorr J, Oehninger S, Toner J, Hsiu J, Lanzendorf S, Williams R, et al. Functional studies of s.c. ovarian transplants in nonhuman primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Human Reprod.* 2002; 17:612-619.
- Shaw J, Bowles S, Koopman P. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Human Reproduction.*1996; 11: 1668-1673.
- Silber SJ, Lenahan KM, Levine DJ, Pineda JA, Gorman KS, Friez MJ, Crawford CE, et al. Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med.*2005; 353:58-63.
- Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update.*2004; 10: 251-266.
- Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin Tan S, Gosden R. Fertility after intact ovary transplantation. *Nature.*2002; 415: 385.
- Wolner-Hanssen P, Häggglund L, Ploman F, Ramirez A, Manthorpe R, Thuring A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 41/2 years after autologous stem cell transplantation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005; 84:695-698.
- Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tans SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod.*2003; 18: 1165-1172.